

나균 생존 평가를 위한 Propidium Monoazide를 이용한 실시간 중합효소연쇄반응의 의의

김종필, 김연실, 김찬우

한국한센복지협회 연구원

Evaluation of Propidium Monoazide Real-Time PCR for Viability of *Mycobacterium leprae*

Jong-Pill Kim, M.D., Yeon-Sil Kim, M.D., Chan-Woo Kim, M.D.

Institute for Leprosy Research, Korean Hansen Welfare Association

Background : Conventional acid-fast bacilli (AFB) staining cannot differentiate viable from dead cells. Propidium monoazide (PMA) is a photoreactive DNA-binding dye that inhibits PCR amplification by DNA modification.

Object : The author evaluated whether PMA real-time PCR is suitable for the viability of *Mycobacterium leprae*(*M. leprae*) in specimens of cultivation in mouse foot pads.

Methods : A total of 55 diluted suspensions from mouse foot pads were quadruplicated and subjected to PMA treatment and/or heat inactivation, and were also tested to compare the Δ CT values (CT value in PMA-treated samples-CT value in non-PMA-treated samples). Real-time PCR was performed using QuantiTect SYBR® Green PCR Kits(Qiagen, USA), and the CT value changes after PMA treatment were compared between PMA treatment and/or heat inactivation groups.

Results : The increase in the CT value after PMA treatment was significant in heat inactivated group(4.26) and non-heat inactivated group(1.12)(both P = 0.000). In the ROC curve analysis, the cutoff Δ CT value for maximum sensitivity (100%) and specificity (97.1%) for differentiating dead from live cells was 2.41

Conclusions : PMA real-time PCR is a useful approach for evaluating viability of *M. leprae*.

※ Key Words : *Mycobacterium leprae*, Propidium monoazide, Real-time PCR

서론

나균 생존력의 측정은 약물을 평가, 약물 내성 균주 검출, 백신 후보 물질 평가, 숙주-병원체 상호작용, 독성 요소 및 신경친화력

이해 등을 하기 위해 고안된 다양한 연구에서 유용하다. 한센병 연구자는 나균 배양 어려움을 잘 알고 있어 나균의 생존력을 정확하고 반복적으로 측정할 수 있는 대체 방법을 꾸준히 연구해 왔다.¹ (Table 1.)

Table 1. Overview of current viability assays for *M. leprae*¹

Method	Measures	Assay time	Assay Complexity ^a	Assay Cost	Sample Storage ^b	Host tissue affects results ^c	Sensitivity ^d
Mouse Foot Pad (MFP)	Bacterial multiplication	6~12months	High	High	Fresh	-	+++ ^e
Morphological Index (MI)	Membrane integrity	≤ 1day	High	Low	Fresh	+	++
Vital Stains	Membrane integrity	≤ 1day	Low	Low	Fresh	+	++
³ H-purine / pyrimidine uptake	Nucleic acid synthesis	7-14days	Moderate	Moderate	Fresh	+	++
Mass Spectrometry	Na+/K+ratio	≤ 1day	High	High	Fresh	++	++
Adenosine triphosphate (ATP)	Over allenergy metabolism	≤ 1day	Moderate	Moderate	-70°C, not fixed	++	+
PGL-1 Synthesis	Anabolic metabolism	2-3days	High	Low	Lyophilized	-	+
Radiorespirometry (RR)	β-oxidationrate	7days	Moderate	Moderate	Fresh	-	++
Molecular Assays	Quantity of target RNA	2-3days	Moderate	Moderate	Fixed at RT	-	+++

^aComplexity judged by assay set-up, reagents, instrumentation, or interpretation of read-out ^bFresh: sample must be processed immediately ^c++host tissue must be completely removed, +host tissue may make interpretation difficult, -host tissue does not interfere ^dSensitivity: number of *M. leprae* required for assay:+++<10⁵,++=10⁵-10⁷,>10⁷ ^eBased on the proportional bactericidal technique,1-5*M. leprae* bacilli can survive and grow in the MFP.²

Propidium monoazide(이하 PMA)는 DNA 변형에 의한 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR) 증폭을 억제하는 광 반응성 DNA 결합 염료이다. 이 화합물은 손상된 세포벽에는 침투할 수 있지만 손상되지 않은 세포벽에는 침투하지 않는다. 따라서

※ 교신저자 : 김종필
 전자우편 : dr_jpkim@hotmail.com
 주 소 : 경기도 의왕시 원골로 59
 한국한센복지협회(031-452-7094)

PMA는 손상된 세포에서 DNA를 선택적으로 변형시킬 수 있다.³

죽은 세포를 PMA로 처리하면 화합물이 DNA 증폭을 억제하여 PCR 증폭 신호가 검출되지 않거나 CT값(특정 제품이 검출되기 전의 PCR 사이클 수를 측정한 값)이 PMA로 처리하지 않은 죽은 세포에 비해 높게 나타난다. 살아있는 세포에서 PMA는 PCR을 억제하지 않는다. 따라서 이 시약의 존재 하에 CT값에는 거의 차이가 나타나지 않을 것이다. 저

자는 이 방법이 나균에 대한 연구가 진행되어 보고된 바가 없어 나균에서의 PMA을 이용한 나균 생존 평가 활용에 대해 조사하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시험 프로토콜의 확립 및 PMA 처리 조건의 최적화

PMA의 효과는 최종 농도와 노출 강도에 영향을 받는다. 본 실험에서 PMA처리에 따른 균 생존 여부를 판단하기 위해 다양한 조건으로 실험을 실시하였다.

균 현탁액은 한국한센복지협회 연구원 동물 실험실에서 누드마우스에서 개대배양 중인 나균 55예를 이용하였다. 나균 현탁액을 먼저 열불활성화(heat inactivated) 처리 비교, PMA 처리 비교를 위해 동일한 검체에서 얻은 균액을 각각 500 μ L 부피로 분주하였다. 열불활성화를 위해 균 현탁액을 80°C에서 20분간 및 95°C에서 15분간 가열하였다. 시험된 PMA 농도는 50 및 100 μ M이었다. PMA 처리에 관계없이 Qiagen사의 BLU-V® System

을 이용하여 제조사의 지침에 따라 광선에 노출하였으며, 노출 시간은 10분을 기준으로 하였으며, 비교실험을 하기 위해 일부 시료에서 20분간 노출하였다. 각 조건은 Table 2와 같다.

열불활성화를 위해 균 현탁액을 두가지 조건(80°C/20분, 95°C/15분)으로 실시하였고, PMA 처리는 Qiagen사의 BLU-V Viability PMA Kit를 이용하여 PMA 농도(50 및 100 μ M), 노출시간(10분 및 20분) 조건 하에 제조사의 지침에 따라 실시하였다. 동일한 나균 현탁액을 각각 500 μ L씩 분주하여, 13,000xg 5분간 원심 분리한 후 상층액을 버리고 이를 BLU-V Viability PMA Kit에 포함된 EB액 500 μ L으로 재용해하여, 열불활성화 여부에 따라 처리한 후 PMA 최종 농도에 따라 PMA 용액을 추가한 후, PMA 혼합 시료를 광선 차단 하에서 실온에서 10분 동안 유지하였다. 이후 BLU-V® System을 이용하여 제조사의 지침에 따라 2가지 노출 시간 조건으로 광선에 노출한 후 DNA 추출을 실시하였다.

PMA 처리 및 PMA 처리되지 않은 시료의

Table 2. Protocol summary of PMA treatment, heat-inactivated, DNA preparation

Protocol	PMA conc.(μ M).	Heat-inactivated($^{\circ}$ C/min.)	Expose time(min.)	Prep. method
A	50	80/20	20	Enzyme use
B	50	80/20	20	none
C	50	90/15	10	none
G	100	80/20	10	none
H	150	80/20	10	none
I	50	80/20	10	none

DNA 추출 및 실시간 PCR에 대해 동일하게 처리되었다. DNA 추출은 주로 Qiagen사의 QIAamp DNA Mini Kit를 이용하여 제조사의 지침에 따라 실시하였고, 일부 예에서 DNA 및 RNA 추출을 위해 동사의 AllPrep DNA/RNA Mini Kit를 사용하였다.

실시간 PCR을 위한 Primer-BLAST를 이용하여 나균 RLEP4(X17152.1)에 대한 시발체(forward: ACCATTTCTGCCGCTGGTAT, reverse:ATCTGCGCTAGAAGGTTGCC)를 제작하여 QuantiTect SYBR® Green PCR Kits(Qiagen, USA)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 실시하여 실시간 PCR 중합효소 연쇄반응을 시행하여 CT값을 계산되었다. 열불활성화를 비처리 PMA 처리 대조군 시료에 비해 PMA 처리 열불활성화를 시료에서 CT값의 최대 증가를 유도하고, PMA 처리되지 않은 대조군 세포에 비해 PMA 처리 비열불활성화 시료에서 CT값이 가장 적게 증가하는 조건을 선택하도록 하였다.

2. 시간에 따른 균 동태에 대한 실험

누드마우스에서 얻은 나균의 시간 경과에 따른 CT값의 변화를 알아보기 위해 일부 시료를 냉장보관(평균 6.2일) 한 후 PMA 처리 여부에 따른 CT값의 변화를 조사하여 보았다. PMA 처리, DNA 추출 및 실시간 PCR에 대해 동일한 조건에서 실행하였다.

3. 데이터 분석

통계 분석은 SPSS 통계 프로그램으로 수행되었다.

1) 시험 프로토콜의 확립 및 PMA 처리 조건의 최적화

PMA로 처리한 시료와 투여하지 않은 시료

를 비열불활성화 집단과 열불활성화 집단 내에서 짝을 지어 CT값의 차이 또는 증가를 계산하였다(Δ CT, PMA 처리된 시료의 CT값 - PMA 미처리된 시료의 CT값). 쌍 데이터는 Wilcoxon signed rank test를 사용하여 분석되었다. PMA 처리는 열불활성화 집단에서 Δ CT가 유의미한 경우 ($P < 0.05$), 살아있는 비열불활성화 집단에서 유의하지 않은 경우 죽은 세포와의 생존을 구별하는 데 유효한 것으로 간주되었다($P \geq 0.05$).

2) 시간에 따른 균 동태에 대한 실험

CT값은 PMA 처리한 것과 하지 않은 것의 각 쌍의 시료로부터 얻어졌으며, Δ CT값이 계산되었다. 누드마우스에서 얻은 나균의 시간 경과에 따른 차이를 즉시 DNA 추출한 시료와 일정시간 경과 후 추출한 DNA 간의 Δ CT값을 비교하기 위해 Mann-Whitney 검정을 사용하였다.

3) 생존 여부 평가를 위한 Δ CT 비교

누드마우스에서 얻은 나균에서 비열불활성화 집단을 생존으로 열불활성화 집단을 사멸로 간주하고 추출한 DNA시료에서 비열불활성화 집단과 열불활성화 집단 간의 Δ CT의 비교를 이용하여 ROC 곡선 분석을 수행하여 살아있는 세포와 죽은 세포를 구별하기 위한 최적의 컷오프 Δ CT값을 결정하였다. 이를 통하여 생존 여부를 확인하는 Δ CT의 감수성과 특이성을 추론하였다.

결 과

시험 프로토콜의 확립을 위한 PMA 처리 등 시험조건의 최적화(Table 3, 4)

Table 3. Descriptive statistics

	Total	PMA concentration			Protocol	
	(No:34)	50uM(No:28)	100uM(No:23)	A(No:11)	B(No:19)	G(No:10)
	ΔC (range)	ΔC (range)	ΔC (range)	ΔC (range)	ΔC (range)	ΔC (range)
Non-heat-inactivated	1.1168 (-.54~4.32)	1.1886 (-.05~4.57)	1.1274 (-.54~4.32)	.9482 (.14~1.73)	.8926 (-.05~1.99)	1.6500 (-.54~4.32)
Heat-inactivated	4.2559 (2.42~7.52)	3.4482 (-1.88~6.32)	4.1609 (2.18~7.52)	3.9800 (3.19~5.85)	3.6374 (2.42~4.71)	5.2310 (3.24~7.52)

	Exposure time		Enzyme	
	10min.(No:37)	20min.(No:15)	Enzyme+(No:11)	Enzyme-(No:44)
	ΔC (range)	ΔC (range)	ΔC (range)	ΔC (range)
Non-heat-inactivated	1.2554 (-.54~4.57)	.9040 (.14~1.73)	.9482 (.14~1.73)	1.1720 (-.54~4.57)
Heat-inactivated	3.6970 (-1.88~7.52)	3.9167 (2.65~5.85)	3.9800 (3.19~5.85)	3.7477 (-1.88~7.52)

Abbreviations: PMA, propidium monoazide; ΔC T, CT of PMA-treated specimen-CT of PMA-untreated specimen

Table 4. Test Statistics^b

	Total		PMA concentration			
	ΔC (Non)	ΔC (Heat)	50uM		100uM	
	ΔC (Non)	ΔC (Heat)	ΔC (Non)	ΔC (Heat)	ΔC (Non)	ΔC (Heat)
Z	-4.882a	-5.086a	-4.577a	-4.486a	-3.939a	-4.197a
P	0	0	0	0	0	0

	Protocol					
	A		B		G	
	ΔC (Non)	ΔC (Heat)	ΔC (Non)	ΔC (Heat)	ΔC (Non)	ΔC (Heat)
Z	-2.934a	-2.934a	-3.706a	-3.825a	-2.599a	-2.803a
P	0.003	0.003	0	0	0.009	0.005

	Exposure time				Enzyme			
	10 min.		20 min.		Enzyme(+)		Enzyme(-)	
	Δ C (Non)	Δ C (Heat)	Δ C (Non)	Δ C (Heat)	Δ C (Non)	Δ C (Heat)	Δ C (Non)	Δ C (Heat)
Z	-5.062a	-5.212a	-3.408a	-3.408a	-2.934a	-2.934a	-5.526a	-5.707a
P	0	0	0.001	0.001	0.003	0.003	0	0

Abbreviations: P, Probability of significance (both sides); Δ CT, CT of PMA-treated specimen-CT of PMA-untreated specimen; Non, Non-heat-inactivated samples; Heat, Heat-inactivated samples; a, a based on the negative ranks; b Wilcoxon Sign-Rank Test

조건에 관계없이 PMA 처리 이전 이후의 Δ CT의 평균값은 비열비활성화는 1.1168, 열비활성화는 4.2559로 모두에서 통계적으로 유의하였고(P=0.00), 그 차는 Fig. 1과 같다.

1) PMA 농도에 따른 결과

PMA 농도에 따라 PMA 처리 이전 이후의 Δ CT의 평균값은 PMA 농도 50uM에서는 비열비활성화는 1.1886(P=0.00), 열비활성화는 3.4482(P=0.00)로, PMA 농도 100uM에서는 비열비활성화는 1.1274(P=0.00), 열비활성화

는 4.1609(P=0.00)로, 모두에서 통계적으로 유의하였다(P=0.00).

2) 각 실험 계획안 Protocol에 따른 결과

각 실험 계획안 간의 PMA 처리 이전 이후의 Δ CT의 평균값은 A안에서는 비열비활성화는 0.9482(P=0.03), 열비활성화는 3.98로(P=0.03), B안에서는 비열비활성화는 0.8926(P=0.00), 열비활성화는 3.6374(P=0.00)로, G안 비열비활성화는 1.65(P=0.09)를 나머지는 통계적으로 유의하였다. C안, H안, I안으로 실험

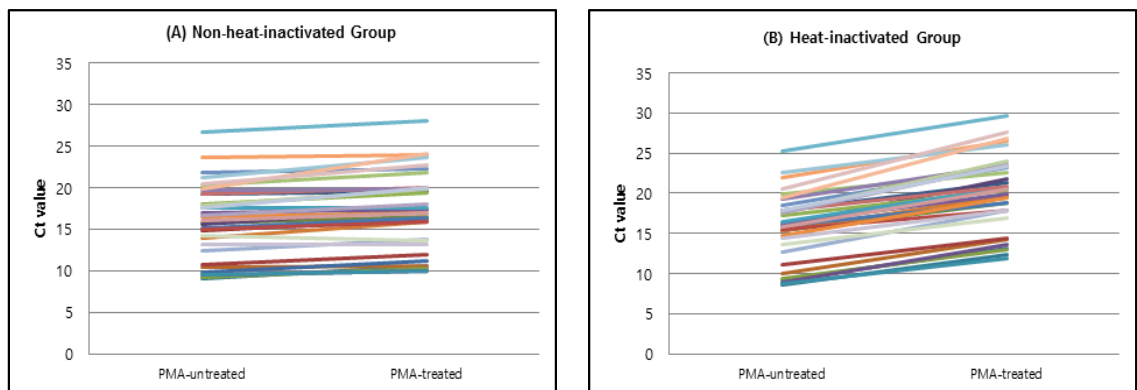


Fig. 1 Difference between the CT values of PMA-treated and PMA-untreated samples, Compared with the PMA-untreated non-heat inactivated (A) group, increases in CT values in the PMA-treated non-heat inactivated (A) group ranged from -0.54 to 4.32 and were significant; compared with the results for the PMA-untreated heat inactivated (B) group, increases in the CT values in the PMA treated heat-inactivated (B) group ranged from 2.42 to 7.52 and were significant (Wilcoxon signed rank test, P = 0.000, P = 0.000, respectively). Abbreviation: PMA, propidium monoazide.

한 경우는 실험 예가 부족하여 통계처리 결과를 구할 수 없었다.

3) 광노출 시간에 따른 결과

광노출 시간에 따라 PMA 처리 이전 이후의 ΔCT의 평균값은 광노출 10분에서는 비열비활성화는 1.2554(P=0.00), 열비활성화는 3.697 (P=0.00)로, 광노출 20분에서는 비열비활성화는 0.904(P=0.00), 열비활성화는 3.9167 (P=0.01)로, 모두에서 통계적으로 유의하였다.

4) 효소(lysozyme)사용 여부에 따른 결과

효소(lysozyme)사용 여부에 따라 PMA 처리 이전 이후의 ΔCT의 평균값은 비사용 시에서는 비열비활성화는 0.9482(P=0.03), 열비활성화는 3.98(P=0.03)로, 사용 시에서는 비열비활성화는 1.172(P=0.00), 열비활성화는 3.7477 (P=0.01)로, 모두에서 통계적으로 유의하였다.

시간에 따른 균 동태에 대한 실험

나균 추출 후 시간 경과에 따른 PMA 처리 이전 이후의 ΔCT의 평균값은 비지연 시에서는 1.0195, 지연 시는 1.185676으로 통계적 의의는 없었다(P=0.21) (Table 5, 6).

Table 5. Descriptive statistics (delayed)

	ΔCT (range)
Non-delayed (No of samples:40)	1.0195(-.54~4.32)
Delayed* (No of samples:37)	1.185676(-1.92~4.94)

*Mean of delay : 6.2 days

Abbreviations : PMA, propidium monoazide; Δ CT, CT of Delayed specimen-CT of On time specimen

Table 6. Test Statistics Table of Mann-Whitney Test(Group: delays)

	ΔC
U of Mann-Whitney	619.500
W of Wilcoxon	1439.500
Z	-1.229
P	.219

Abbreviations : P, Probability of significance (both sides)

생존 여부 평가를 위한 ΔCT 비교

비열비활성화 집단과 열비활성화 집단 간의 ΔCT의 비교를 이용하여 ROC 곡선 분석은 표 그림과 같다. 살아있는 세포와 죽은 세포를 구별하기 위한 최적의 컷오프 ΔCT값은 본 실험에서는 2.41로 추론되었으며, 이에 따른 생존 여부를 확인하는 ΔCT값 2.41의 감수성은 1.0, 특이성은 0.971로 계산되었다(Fig. 2,3).

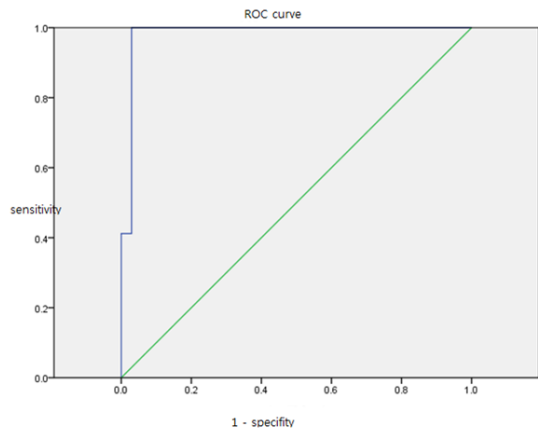


Fig. 2 ROC curve for Assay result

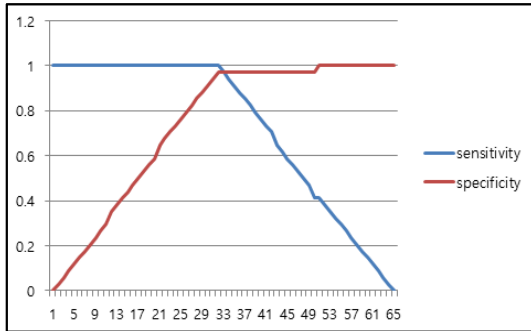


Fig. 3 Curve for Calculation of sensitivity and specificity

고찰 및 결론

Propidium Monoazide(PMA)를 이용한 방법은 세균 및 곰팡이 균주에 대한 생존 가능한 세포와 죽은 세포의 신속한 구분을 위해 사용되어왔다.⁴⁻⁷

본 연구에서 조건에 관계없이 PMA 처리 이전 이후의 ΔCT의 평균값은 비열비활성화는 1.1168, 열비활성화는 4.2559로 모두에서 통계적으로 유의하였다(P=0.00). 이는 PMA 처리 조건에 대해서는 Kralik 등⁹은 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*의 PMA로 처리하면 죽은 세포가 100% 포함된 시료에서만 정량주기가 현저히 증가한다는 보고와 Ricchi 등⁸에 의한 유사보고와 일치한다. 또한 생존 균에서의 PMA 처리 이전 이후 간의 증폭주기의 차이는 다른 경우에 비해 낮았고, qPCR에 대한 PMA의 억제 효과가 죽은 세포에만 특이적이라면 0에 가까워야 하나 Kralik 등⁹ 및 Nocker 등⁶, Ricchi 등⁸의 보고에서도 차이는 약 1~2주기 정도라는 보고와도 일치한다. 죽은 균과 살아있는 균의 백분율을 달리하여 인위적으로 혼합된 집단에서 4.67(100% 생존균), 3.32(75% 생존균),

2.87(50% 생존균), 2.45(25% 생존균), 1.75(0% 생존균)으로 증폭주기의 차이가 확인되었고, 전반적으로 이 방법이 혼합 집단에 존재하는 죽은 세포의 비율에 따라 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*의 생존력 상태를 구별할 수 있음을 발견했다고, *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*의 경우 증폭주기의 차이가 1.08보다 낮으면, 생존균만 포함될 확률이 적어도 80%, 4.81보다 높으면 죽은 균이 포함될 확률이 80%라고 보고⁸가 있어 나균에서도 이에 상응하는 조건하에서 결과를 조사할 필요가 있을 것으로 사료된다.

PMA 처리 등 시험조건의 비교에서 ΔCT의 평균값 기준으로 PMA 농도는 100uM, 광노출시간은 20분, DNA 추출시 효소를 사용하는 것이 좀더 효율적으로 나왔으나, Wilcoxon signed rank test를 사용 분석시 모두 통계적으로는 의의가 있었다. 이는 Kim 등¹⁰은 50μM의 농도를 사용하여 CT값이 살아있는 세포보다 죽은 세포에 대해 충분히 높아 보고하였다. PMA의 농도가 높을수록 죽은 세포에서 더 높은 CT값을 유도할 뿐만 아니라 세척된 시료에서 과도한 세포벽 침투 또는 광활성 PMA가 생겨 생균에 대한 PCR을 억제한다. PMA농도에 대한 재평가가 필요할 것으로 사료된다.

PMA의 광 활성화를 위해 일반적으로 500~800W의 광 강도가 사용된다.^{4,5} Kim 등¹⁰은 PMA의 광 활성화에 대한 최상의 조건으로 600W, 광-시료 거리 20cm, 노출 시간 5분이라고 보고하였다. 본 연구에서는 Qiagen사의 BLU-V® System을 이용하여 제조사의 지침에 따라 실험하여 광량 및 광-시료 거리 조건에 대한 실험을 진행하지 못하였

다. 다만 광노출 시간만 10분, 20분으로 비교하여 실험하여 20분이 좀더 나은 것으로 사료되었다. 또한 광활성 PMA의 DNA 결합 친화성으로 인한 생존 가능한 세포에서 추출한 DNA에 결합하는 것을 피하기 위해 DNA 추출 단계 전에 잔류 PMA를 제거해야 하며, 50 μ M PMA 처리 후 씻지 않은 시료를 사용한 PCR의 초기 시험에서 PCR은 억제되었으며 내부 대조군의 신호는 관찰되지 않았다고 보고하였다.¹⁰ 본 연구에서도 DNA 추출 전 세척 단계를 거쳤다. 다만 잔여 PMA를 제거하기 위한 반복적인 세척은 세포를 손실될 수 있는 가능성에 대해 고려해야 할 것으로 사료된다. 이에 대한 추가 연구도 필요할 것으로 사료된다.

나균 추출 후 시간 경과에 따른 PMA 처리 이전 이후의 Δ CT의 평균값은 비지연 시에서는 1.0195, 지연 시는 1.185676으로 통계적 의의는 없었다($P=0.21$). 나균을 보관 중 사멸에 대한 평가를 위한 자료되는 의미를 가질 수 없는 결과로 사료되면 이에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서 살아있는 세포와 죽은 세포를 구별하기 위한 최적의 임계점 Δ CT값은 2.41로 추론되었으며, 이에 따른 생존 여부를 확인하는 Δ CT값 2.41의 감수성은 1.0, 특이성은 0.971로 계산되었다. 이는 결핵균에서 실시한 Kim 등¹⁰은 가장 좋은 민감도(89.9%)와 특이도(85.7%)로 조사된 임계 Δ CT값은 3.4이라고 보고하였다. 그러나 임계점보다 높은 Δ CT가 높은 배양 양성 증례가 관찰되었는데, 이는 표본에서 살아있는 세포와 죽은 세포가 혼합되어 있기 때문에 발생할 수 있다. 치료를 받는 환자나 가래 오염 제거 환자의 경우에서 임계점보다 Δ CT값이 낮은 배양 음

성 사례도 관찰되고, 배양 양성을 살아있는 간균 존재의 증거로 간주했기 때문에 이러한 낮은 Δ CT값과 배양 양성 사이의 관계를 평가한 한계라고 Kim 등¹⁰은 보고하였다. 또한 모든 생존 가능한 세포가 배양 가능하지는 않아, 임상 시료는 생존 가능하지만 배양이 되지 않을 가능한 간균을 포함할 수 있으며, 이 시료는 음성 배양 결과를 제공 함에도 불구하고 낮은 Δ CT값을 산출할 수 있다고 보고하였다. 이것은 PMA 처리방법의 다른 한계이다.

향후 로지스틱 회귀모델을 이용한 주어진 시료에서 생존 가능한, 혼합된 또는 죽은 균의 다른 모집단을 포함할 확률을 추정하고, 분석의 분석 민감도를 향상시키기 위해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. <http://www.internationaltextbookkofleprosy.org/chapter/assays-determining-viability-mycobacterium-leprae>
2. Welch TM, Gelber RH, Murray LP, Ng H, O'Neill SM, Levy L. Viability of Mycobacterium leprae after multiplication in mice. Infect Immun 1980;30:325-328.
3. Fittipaldi M, Nocker A, Codony F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. J Microbiol Methods 2012;91:276-89.
4. Brescia CC, Griffin SM, Ware MW, Varughese EA, Egorov AI, Villegas EN. Cryptosporidium propidium monoazide-PCR, a molecular biology-based technique for genotyping

- of viable *Cryptosporidium* oocysts. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:6856-6863.
5. Yáñez MA, Nocker A, Soria-Soria E, Múrtula R, Martínez L, Catalán V. Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *J Microbiol Methods* 2011; 85:124-130.
 6. Nocker A, Mazza A, Masson L, Camper AK, Brousseau R. Selective detection of live bacteria combining propidium monoazide sample treatment with microarray technology. *J Microbiol Methods* 2009;76:253-261.
 7. Miotto P, Bigoni S, Migliori GB, Matteelli A, Cirillo DM. Early tuberculosis treatment monitoring by Xpert(R)MTB/RIF. *Eur Respir J* 2012;39:1269-1271
 8. Ricchi M, De Cicco C, Kralik P, Babak V, Boniotti MB, Savi R, et al. Evaluation of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk using peptide-mediated separation and PropidiumMonoazide qPCR. *FEMS Microbiol Lett.* 2014 Jul;356(1):127-133.
 9. Kralik P, Nocker A, Pavlik I. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidiummonoazide treatment. *Int J Food Microbiol* 2010;141 (suppl 1):S80-S86.
 10. Kim YJ, Lee SM, Park BK, Kim SS, Yi J, Kim HH, et al. Evaluation of Propidium Monoazide Real-Time PCR for Early Detection of Viable *Mycobacterium tuberculosis* in Clinical Respiratory Specimens *Ann Lab Med* 2014;34:203-209